

あったものとしては、紫外線吸収剤 10 種、香料 4 種、抗生物質・抗菌薬 8 種、抗炎症薬・鎮痛薬 3 種、その他の薬剤 11 種、その他の化学物質 4 種となり、計 40 種であった。紫外線吸収剤の比率が高いが、それ以外は比較的広い領域から選択されていて、被験物質の選択は適切であったと考えられる。水溶性の低い被験物質について、プロトコルの範囲で使われる溶解助剤を用いた判定結果は大きくは変動しなかった。しかし、被験物質の溶解剤などが 3T3-NR 法に与える影響について充分議論できるようなプロトコルとはなっていない。

6-3-3) in vivo 試験結果との対応性について

In vivo 試験結果との対応性として、我々は 3 つの研究のデータをまとめて、In vivo (ヒト、動物) と予測モデル (PIF、MPE) の結果との関係を検討した。文献に記載された被験物質について、1) 論文間での重複を避ける、2) 塩部分のみ異なる場合は同じ物質とする、3) in vivo データが明確に示されているもののみ採用するという条件で吟味したところ、採用できた有効被験物質数は、26~38 であった。これらについて、評価指標として、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率を求めた。この結果、ヒト試験を優先した場合のヒトまたは動物の結果と PIF の関係は、感度 91.6%、特異度 78.6%、陽性予測力 88.0%、陰性予測力 84.6%、一致率 86.8%であり、MPE では、感度 94.7%、特異度 75.0%、陽性予測力 85.7%、陰性予測力 90.0%、一致率 87.0%と全体として高かった。この結果から、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効な試験法であると思われる。特にヒトで陽性とされている物質を陽性とする感度が PIF で 91.6%、MPE で 94.7%と高い値を示したことは本試験法をスクリーニング法として用いることの妥当性を示している。また、2 つのパラメーター (PIF、MPE) を併用することにより巾広い薬物について光毒性の程度についての数値データが得られ、また、false negative を減らすことができ、評価に有用であると思われた。

なお、6-4) で示した様に、ZEBET より提供された個別データの解析から施設間の評価の食い違いの多くが技術的なものによることが確認された。プロトコルを改善し、それに従って適切に試験を遂行することにより、更に誤評価が減るものと考えられた。一方、光毒性陽性物質として用いた furosemide の評価結果のばらつきは技術的なものとして説明できなかった。しかし、furosemide の光毒性は 1985-1990 年にドイツ、オーストリア、スイスの光パッチテストグループが行った臨床試験で陰性であったこと (Holzle et al, J. Am. Acad. Dermatol. 1991, 25, 59-68.)、また、公開シンポジウムの席で、furosemide による臨床での光毒性はアレルギーによるものであるとの指摘が臨床医師よりなされたことから、バリデーションで急性の光毒性陽性物質として furosemide を用いたのは適切では無かったと考えられる。

6-3-4) 3T3-NR 法の信頼性について

信頼性については、報告により記載が様々であった。施設内再現性については、UV Filter に関する Phase III 研究結果から評価することが望ましいと思われる。この研究は4つの施設で20物質を評価しており、報告には各施設で行われた2回の試験について個々の用量反応曲線から算出された PIF、MPE の値がそれぞれ記載されている。2つの PIF 値の比でみた場合、3倍を超える物質は、のべ80物質中わずか4物質であり、施設内再現性は悪くなかった。

施設間再現性については、それぞれの研究で評価方法が異なっている。Phase I 研究では施設毎に得られた PIF 値を被験物質毎に集計して箱ヒゲ図で示された。その結果は95%信頼限界の幅は15物質中1物質を除き比較的狭いが、最大値と最小値の間に10倍以上の大きな差のある物質が6個と多いことを示している。Phase II 研究では、得られたデータを復元抽出することにより用量反応曲線を繰り返し再現し、その変動を評価する CV (classification variability) という指標を用いて評価されている。11施設で30物質を評価した Phase II 研究では、CV の最高値は、PIF で18.8%、MPE で20.0%となっており、それほど大きな値とはなっていない。一方、UV Filter に関する Phase III 研究では、測定されたデータを施設間、実験間、繰り返しの3つの要因に分け、変動係数が評価指標とされている。この係数も CV (coefficients of variation) として標記されているが、Phase II 研究の CV とは本質的に異なる指標である。UV Filter 研究では、施設間と施設内の CV が比較されており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きかった (PIF、MPE のいずれも最高値は約200%であった)。物質によっては、PIF や MPE の値が10倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値をもとに評価した場合、施設間再現性は低いと思われる。一方、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11施設で評価された Phase II 研究では、判定不能とされた1物質を除いた29物質中 PIF で13物質、MPE で11物質である。このうち、3施設以上食い違ったのは PIF で3物質、MPE で1物質であり、それ以外の場合、判定に食い違いを生じた施設数は11施設中の2施設以下であった。また、4施設で評価された Phase III 研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20物質中 PIF で4物質、MPE で3物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、PIF や MPE の値レベルでの施設間の再現性は高いとは言えないが、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

即ち、PIF や MPE の値のバラツキが光毒性の予測性に大きな影響を与えている場合は少ないが、施設によって他施設とかけ離れた値が得られたということである。

本来、再現性を調べる場合、施設毎の生データをもとに解析するのが常道であり、これがもっとも重要な点である。そこで、今回の結果についてもその後 ZEBET よりバリデーシンの個別データの提供を受け、施設による評価の相違の原因についての検討を実施した。その結果、

furosemide の場合を除き、一部の施設のみ他者とかけ離れた用量作用曲線を示している場合が多いことが確認され、大きなバラツキの現れた事例のほとんどが技術的な原因によると推定された（補足1）。

6-3-5) 文献情報に基づく総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、3T3-NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は特異度を除き 90%前後と高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であると言えるだろう。

なお、文献上からの評価では生データやバリデーションにおけるデータ検討会や management 会議の議事録等によるデータの確認はできない。したがって、データの質を十分に確かめることはできない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陽性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあると思われた。そこで、次項に示したように Dr Spielmann よりバリデーションデータのパッケージの提供を受け、論文データと判定能力の確認および評価結果のバラツキの要因について検討した。

6-4) Dr Spielmann より提供された EU/COLIPA のバリデーションデータ集による検討

Dr Spielmann より直接入手したデータパッケージによる論文データの確認と評価結果のバラツキの要因について検討の結果、Phase II および Phase III のバリデーションに関する論文データを確認することができた。一方、PIF 値と MPE 値の論文データとの整合性を調べたところ、PIF 値については若干数値が異なっていたもののほとんど同じ結果が得られていた。また、転記ミスと思われる相違が一点認められた。一方、MPE 値に関しては大きな差が認められた。これらの値の相違の理由については用量作用曲線推定のためのソフトが更新されたこと、及び MPE 値計算のために使用した測定点数が提供データでは多くとったことによることが確認された。

また、提供されたデータファイルから、実施された全ての試験結果を用い、評価結果を in vivo 光毒性試験結果と比較したところ、MPE 値による評価では偽陰性が 6.30%、陽性物質を probable としたものが 1.68%、偽陽性が 10.58%、陰性物質を probable としたものが 1.17%、陰性物質を正しく陰性と評価したものが 83.52%、陽性物質を正しく陽性としたものが 91.17%であった。PIF 値による評価ではそれぞれ 9.24%、8.40%、2.35%、4.7%、88.23%、81.51%であった。このようにデータファイルからの評価によってもその結果は論文での評価とほとんど同じ結果であり、3T3-

NR法が光毒性を予測する能力が高い事が確認された。

一方、被験物質による濃度—細胞毒性曲線が施設により大きく異なっている場合が多く認められた。これらは光毒性の判定に影響を与えた可能性があり、本試験に関する実際の試験に従事する者への技術教育が重要であることが示された。

光毒性の有無に関して誤判定の現れた理由についての検討では、多くの場合1施設のみが、かけ離れた用量作用曲線を示したために生じたことによる誤判定であることが明らかになった。この原因として、被験物質の水溶解性が判定に影響を及ぼした可能性について検討したが、水溶性の低い物質の取り扱いに関する技術的なミスによるものと思われる場合もあったが、水溶性の高い物質についても誤判定が認められ、被験物質の水溶解性のみが原因とは考えにくかった。また、furosemide に関しては半分近くに施設で偽陰性となっていたが、データからはその原因を判断できなかった。

また、OECD のガイドライン案に示されたグレイゾーン(probable phototoxicity)の設置の効果についてはこの設置により false negative を完全になくすことはできなかったが、19件から14件へとかなり減少することが判明した。

6-5) in vivo 光毒性に関する文献調査

Dr Spielmann らのバリデーションで用いられた被験物質の光毒性に関して確認のための文献調査を行った。特に、Furosemide が false negative になった施設が多かったことに関連して、in vivo で光刺激性を示した論文について検討した。即ち、Selvaage & Thune (Photodermatol Photoimmunol Photomed 1997, 13:4-8)はヘアレスマウスで陽性であると報告している。また、Mauget-Faysse ら(Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001, 239:501-8)はFurosemide が強い光を浴びたヒトに起きた眼毒性の原因物質の可能性があるとしており、furosemide が in vivo で光毒性を示す可能性を否定することはできなかったが、ドイツ、スイス、及びオーストリアの医師によるヒト光パッチテスト結果 (Neumann et al, J. Am. Acad. of Dermatology 2001, 42, 183-192) では陰性であったと報告されている。一方、in vitro 実験で Vargas et al (1998)はFurosemide の光照射により一重項酸素を生ずること、また、溶血と脂質過酸化反応を起こすことを示しているが、末梢白血球細胞系では陰性であったと述べている。このように furosemide の光毒性に関しては in vivo および in vitro いずれにおいても試験系により、また報告により相違があり、その理由については今後の検討課題と思われた。但し、その後公開シンポジウムの席で専門の臨床医師より、臨床的に認められるのは光アレルギーであることが指摘された。これ以外の被験物質については neutral red を除き、文献等でそれらの光毒性を確認することができた。

6-6) 3T3-NR 法の受け入れに関して

新しい試験法を行政的に受け入れる際には試験法の普及性、若干の修正に対する頑健性、教育訓練及び専門性の必要性、必要な装置や材料の入手の容易さ、コストとそれに見合う有用性、試験法導入に要する時間、動物愛護の立場から 3 R s の面からの妥当性等について考慮する必要がある。今回検討した 3T3-NR 法はこれらの点でほぼ満足できるものである。この方法は動物実験代替法の側面以外にも、時間的、経済的な面から有利な点も多く、本実験方法がリスクとベネフィットのトータルバランスの点からも優れたものであると考えられる。

今回の光毒性試験の導入で大きな問題は光源である。どのような光源が妥当であるかについてはさらに検討を加えなければならない。光毒性試験を普及させるためには、色々なメーカーの光源についてデータを蓄積する必要がある。

なお、光毒性試験は化粧品のみならず、医薬品や医薬部外品、また、一般化学物質の安全性評価に必要である。また、局所作用のみならず全身的作用、複合作用や代謝による影響などについても十分配慮する必要性も大きい。そのための諸因子を含めた幅広い *in vitro* 実験方法の開発について要望するものである。

6-7) 推奨する試験プロトコールについて

Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験はヒトや動物の光毒性データとの対応や施設間での再現性も良く、光毒性の評価に有効である事が示された。一方、使用する細胞の種類や光源等、必ずしもガイドライン案で示された方法で試験が可能であるとは限らない。そこで、基本的にはこの OECD のガイドライン案に準じた試験法を、データの信頼性を損なわないと思われる範囲で照射条件や用いる細胞株、試験の方法などに自由度を持たせて改変した方法を標準的試験プロトコールとして提案した。

なお、今後の課題として以下の点が指摘される。

① *in vivo* において光刺激性発現の場は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標（ニュートラルレッドの取り込み）の見直しが必要となるかも知れない。

② 評価パラメーターである OECD のガイドライン作成段階で設定された PIF や MPE の cut-off 値の妥当性については実際にはバリデーションが実施されていない。これについては今後のデータの蓄積により再検討が必要となるかも知れない。

③ 代謝活性化については検出感度向上の観点から将来検討すべきと考えられる。

④ bergapten (bergamot oil 中の香料成分)等を含む香料に対して本 3T3 NRU 法の感度が低いことが報告されており、その原因の解明とそれらの光毒性を正確に評価する新たな *in vitro* 試験法の開発が必要である。

⑤ 難溶性物質や製品を評価可能な 3次元皮膚モデルの使用や他の *in vitro* 試験との battery

が考えられるが、今後の課題である。

6-8) 結論

文献に記載された情報のみではデータの質や再現性を十分に明らかにすることはできなかった。しかし、ZEBET の Dr Spielmann より入手したデータファイルを用いた検討により論文で示された結果の大筋の確認とバラツキや誤評価の原因究明を行うことができた。

論文及びデータファイルの両方を用いた解析の結果、3T3-NR 光毒性試験法は、以下に述べられるような限界があるが、in vivo 結果との対応が良く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効である、と結論できる。

以下に本光毒性試験法の主な限界を例示する。

- ①光感受性を検出するための方法ではなく、光刺激性を評価するための方法である。
- ②通常、適切な溶解溶媒のない物質や培養液と混和しても直ぐに分離してしまう物質への適用は困難である。また、着色物質では正しい評価が出来ない場合がある。揮発性の高い物質についても試験系への適応に際しては注意が必要である。
- ③UV-B は内因性光増感物質と反応して細胞毒性を起こすため UV-B 吸収が原因となる光毒性物質の作用はとらえ難い可能性がある。
- ④光毒性発現に代謝活性化を要する物質の評価には適さない可能性がある。
- ⑤光毒性発現における用量依存性の検討は不可能なため、本試験試験法で光毒性物質と評価された物質を使用する際の適切な使用用量や濃度についてはin vivo試験等で確認する必要がある。

なお、技術的な理由によって、誤評価やバラツキが認められる事例がバリデーションで認められたことから、上記を含めた細胞毒性試験法の特徴を良く理解した上で訓練を十分に受けた者が試験に利用しなければならない。また、原因不明の誤評価もわずかであるが認められたこと及び本試験法では感度の低い物質群の存在することも報告されており、今後もそれらの原因について基礎的な検討を進めていく必要がある。更に、光源の変更など、試験法を若干変更した場合の頑健性等については不明確なところもある。このような場合には少数の被験物質を用いて試験法の妥当性について確認しておく必要がある。

補 足 1

EU／COLIPAのバリデーションデータからの論文データの
確認、個別データからの評価のバラツキ原因の検討、及びグ
レーゾーン設置の影響についての検討

捕捉 1)

EU/COLIPA のバリデーションデータからの論文データの確認、個別データからの評価のバラツキ原因の検討、およびグレイゾーン設置の影響についての検討

1) はじめに

EU/COLIPA のバリデーションの中心となった機関である ZEBET の Dr Spielmann より下記 2 論文の基礎となったバリデーションデータと用いられたプロトコルの提供を受けた。そこで論文データの確認作業と誤評価となった施設や被験物質を中心にデータの検討を行った。その結果を示す。

- 1) Spielmann, H. et al., (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
- 2) Spielmann, H. et al., (1998), A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, *ATLA* 26, 679-708.

1) 論文データとの整合性について

施設について

第二および第三相のバリデーション論文に示された全ての施設のデータが入手できた。なお、論文では施設名は匿名とされていたが、個々のデータをつき合わせることで推定した。

PIF 値の整合性について

chlorpromazine、prometadine、rose bengal、penicilline G について論文に示された PIF 値と提供データに示された値と比較した。その結果両者の値は全く同じ値ではなかったが、データ解析に用いた用量作用曲線の推定のためのソフトウェアが両者で異なることによるものであることがデータとともに Dr Spielmann より提供された Bjorn Peters and Hermann-Georg Holhutter の論文に示されている (ATLA: In print)。また、両者の PIF 値に大きな差はなく、相関係数は 0.965 であることを確認した。なお、Hoffman の prometadine については 2 倍程度の差があったが、それほど大きな差ではないとされた。一方、Warsaw の rose bengal の PIF データは論文(1490.2)と報告(108.128)に 10 倍の差があったが、phase II データに示された用量作用曲線から、これはデータの転記ミスであると推定された。

MPE 値の整合性について

MPE 値に関しては以下の表に示したように、nalidixic acid sodium salt を例に、大きな差が有ることが確認された。被験物質全体としても、論文値と提供データからの計算値の相関は 0.799 と、この他の薬物についても大きな差があった。

Nalidixic acid sodium salt の MPE 値について

施設名 (論文における施設番号)	論文	送付データ(Nalidixic fr)
Beiersdorf (Lab 4)	0.790	0.195
FRAME (Lab 9)	0.842	0.17
Hoffmann (Lab 11)	0.633	0.643
P&G (Lab 1)	0.312	0.214
Warsaw (Lab 10)	0.168	0.081
ZEBET (Lab 6)	0.102	0.242
Henkel (Lab 3)	0.717	0.616
Loreal (Lab 2)	0.417	欠如
Unilever (Lab 3)	0.539	0.440

この原因についてはデータとともに提供された Bjorn Peters and Hermann-Georg Holthutter の論文に議論されている (ATLA: In print)。上の用量作用曲線推定のためのソフトの相違以外に MPE 計算のために使用した測定点数が提供データでは多くなったことによる。

光毒性評価結果の整合性について

提供されたデータから、false negative や false positive 等について解析した。なお、この解析においては評価報告書の 4-2-2-2)に示した畑尾の解析とは異なり、被験物質は全て別の物として扱い、送付データから論文の結果を調べた。また、同一の被験物質を複数の施設で試験を行っているがそれらの試験数は施設数とした。phase II と phase III の結果をまとめて以下に示す。

	MPEでの評価		PIFでの評価	
	試験数	%	試験数	% PIF計算不能を 除いた計算
false negative	15	6.30	22	9.24
positiveをprobableに	4	1.68	20	8.40
false positive	9	10.58	2	2.35
negativeをprobableに	1	1.17	4	4.70
true negative	71	83.52	75	88.23
true positive	217	91.17	194	81.51
総数	323		317	
陽性物質試験数	238			
陰性物質試験数	85			

PIF, MPEの強い刺激を採用しての判定	試験数	%
false negative	14	5.88
positiveをprobableに	5	2.1
false positive	9	10.58
negativeをprobableに	1	1.17
true negative	71	83.52
true positive	217	91.1
総数	323	
陽性物質試験数	238	
陰性物質試験数	85	

これらの結果から、光毒性の有無に関する生データからの解析結果と論文からの解析結果はほとんど同じであり、3T3-NR法の信頼性についてはそれらの両面から確認された。また、評価の一致率が $(71+217)/323=0.891$ と約90%ということは極めて予測性が良いと言える。

なお、PIFとMPEの両方の指標を計算し、強い方の結果を採用することによりfalse negativeを0.5%程度減らせた。また、false negativeはgray zoneを設けることで減少したが、完全には無くならなかった。しかし、動物実験データの信頼性について宮地先生から疑問が呈されていることや、ヒトでのパッチテストでも陽性物質として著明な物質でも1%前後の陽性率であること(Spielmann et al, ATLA 28, 777-814, 2000)、また、最終的にヒトで試験することを考えれば、false negativeが5.88%であるという値は充分低いと言える。

3) 用量作用曲線の検討

スクリーンに投影されたバリデーションデータから、施設により評価に相違のあった物質を中心に、用量作用曲線を検討した。その結果、①データには光照射群で非照射群よりviabilityが高くなることがあること(Beiersdorf: hexachlorophen, FRAME: bergamot oil, Hoffmann: acridine)、②薬物添加群でも同様の事があること(Henkel: furosemide, Hoffmann: PABA, Warsaw: chlorhexidine)、③薬物濃度の上昇にともないviabilityがあがること(Beiersdorf: neutral red, Henkel: neutral red, Hoffmann: neutral red, ZEBET: neutral red)、④中間用量以上で光照射による毒性増強が見られない場合があること(Henkel: PABA)、⑤光照射で影響は出ていないが、光非照射群でviabilityが上がり結果としてMFE値が大きくなった場合(Hoffmann: penicilline)、⑥非照射群のデータにバラツキの極めて大きい場合(P&G: 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, 5-methoxypsoralen, methylcoumarin, acridine, amiodaron, furosemideなど)があることが判明した。ただし、これらと予測の施設間のバラツキとの関係については対応性を明らかにすることはできなかった。

なお、用量作用曲線からみるとかなりはっきりしているものでもPIF値あるいはMPE値で陽

性と捉えられないことがあった(Hoffmann: amiodaron, musk, Warsaw: amiodaron, bergamot, ZEBET: amiodarone, bergamot, FRAME: bergamot, Henkel: bergamot, fenofibrate 等)。それらは、低用量域でのデータが重なるとき、非照射の用量作用曲線が横軸に平行のとき、用量作用曲線がなだらかなときにその傾向が認められた。

これらの結果は施設により技術レベルに大きな差があることを示している。技術レベルの向上あるいはプロトコル上での改善が必要と思われた。また、特に境界付近の結果が得られた時は chart 上でのデータの分布と用量作用曲線の形を検討する必要があると思われた。

送付データによる解析による IC50 値レベルでの施設間の差に関しては用量反応曲線が 50% まで落ちていなく結果が多く、施設間差を評価できなかった。

4) 施設間の評価結果のバラツキの検討

phase II 試験の 8-9 施設のデータおよび phase III の 4 施設のデータにおいて false negative となった物質についてその特性を以下に示した。

	試験数	false negative	probable	コメント	水溶性	ethanol溶解性
Amiodarone	9 %	1 12.50	2 25.00	Henkel社のみで細胞毒性が高用量でも出していない。	塩酸塩で 0.07g/100ml	1.28
Anthracene	8 %	2 28.57			不溶性	1g/67ml
Fenofibrate	8 %	1 14.29		Henkel社のみ	実質的に不溶性	slightly sol
Furosemide	8 %	4 42.86	1 14.29		slightly sol	less soluble
Ketoprofen	8 %	1 14.29		Warsawのみ	slightly sol	soluble
Musk ambrette	8 %	1 14.29		Henkel社のみ		
Nalidixic sodium salt	8 %	1 14.29		Warsawのみ	0.1g/ml	0.9g/ml
Ofloxacin -h	8 %	1 14.29	1 14.29	FRAMEと P&G		
Demeclocycline hydrochloride	4 %	1 25.00		P&Gのみ		

amiodarone については水溶性が低いことによる artifact および細胞毒性が比較的強いこと

による影響が考えられる。(Henkel 社のみ 1mg/mL でも細胞毒性が現れていないが、他の施設では 50 µg/mL 以下で細胞毒性が現れている。)

anthracene については水溶性が極めて低いことから培養液中での分離等による影響が考えられる。(Henkel 社と ZEBET のデータは他施設とはかけ離れていた。また、Henkel 社では 5mg/mL でもなんら細胞毒性が現れていない。)

fenofibrate については Henkel 社のみ、ketoprofen については Warsaw 社のみ、Musk ambrette については Henkel 社のみが、nalidixic acid sodium salt では Warsaw 社のみ、demeclocycline については P&G のみ他とはかけ離れた用量作用曲線を示しており、何らかの technical error と思われる。

ofloxacin については FRAME と P&G が他の施設とはかけ離れた用量作用曲線を示しており、やはり何らかの technical error と思われる。

furosemide については施設により差があるだけでなく、同一施設でも結果に差のあることがある。また、false prediction が出た理由が不明であり、更に検討を要する。

なお、2 回の繰り返し実験を行っているが、2 回とも誤評価しているものは少なく、多くは一方が正しい予測をしている。

これらの結果も技術レベルを向上させることにより、誤判定を防ぐ必要性を示している。特に、被験物質の溶解法や溶解の確認に関する教育も必要であることを示している。また、2 回の繰り返し実験での評価が食い違い、陰性となった時(P&G: amiodaron MPE, Warsaw amiodaron PIF, furosemide MPE, FRAME: bergamot MPE, Henkel: furosemide MPE, P&G: ofloxacin MPE)には被験物質の溶解等に留意しながら再試験を行うことにより、誤評価を最小にできるものとする。

5) グレイゾーンの設置について

OECD のガイドライン案では PIF が 2-5, MPE が 0.1-0.15 の間をグレイゾーンとして“probable phototoxicity”と評価することが提案されている。今回、このグレイゾーンの設置による影響を検討したところ、1-1)および 1-3)に記載した表でも判るように、false negative を完全になくすることはできなかったが、19 件から 14 件へとかなり減少することが判明した。

6) まとめ

Dr Spielmann より提供されたデータパッケージにより論文データの確認ができた。また、評価結果がばらついた原因の多くが技術的なものであると推定され、被験物質の溶解や光照射条件、また、培養方法についての訓練が必要と思われた。しかし、furosemide については施設による評価に差がある原因を推定できなかった。また、グレイゾーンの設置により false negative を減らすことができることが確認された。

補 足 2

光毒性陽性物質とされた被験物質についての調査結果

捕捉 2)

In vivo データの信頼性についての検討

1) はじめに

評価会議の席上、バリデーションで使用された被験物質について、in vivo での光毒性の有無について議論された。そこで、それらの光毒性陽性の被験物質について文献的に光毒性について調査した。

2) 調査結果

調査結果は添付の表にまとめた。

なお、Spielmann et al (ATLA 28, 777-814, 2000)は光刺激性に関する 1000 人以上の規模での Neumann et al (J. Am. Acad. of Dermatology 42, 183-192) のヒト試験結果を引用している。そこでは今回陽性物質として使用されており、光毒性物質として広く知られている 0.1% Chlorpromazine(光毒性発現率 5.63%), 0.1% Promethazine (5.15%), 1.0% Hexachlorophe (2.54%), 5.0% Musk ambrette (1.11%), 1.0% bithionol (0.95%), 10% 3-(4-Methylbenzyliden)-camphor (0.95%), 10% p-Aminobenzoic acid (0.71%), 0.1% Tetrachlorosalicylanilide (TCSA, 0.63%)等が、ヒト試験での陽性率が 1%前後で有ることが示されている。また、論文では光毒性について unclear とされていた 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (1.35%)が刺激性を有する事が示されている。一方、Furosemide については一次試験で陰性であったことから二次試験では被験物質から削除されたと記載している。

これら以外の陽性物質については Fitzpatrick et al (In Sunlight and Man, Ed. by Thomas B. Fitzpatrick, University of Tokyo Press, p3-14, 1974)に示されているように、5-MOP, 8-MOP などのフロクマリン類、rose bengal,などの色素、Acridine や Anthracene などのコーラルール成分は接触性光毒性を起こすものとして著明なものであり、Doxycycline は全身性光毒性物質として知られている。

Amiodarone は、Ljunggren および Moller (Acta Derm Venereol 1978, 58, 125-30)が、マウス in vivo 試験で陽性と報告しており、また、Weber et al (Wien Klin Wochenschr 1984, 96, 685-96)は光毒性が 59 人の患者の内 31%に現れたと報告している。

Benzophenon については、Sugiura et al, (Photodermatol Photoimmunol Photomed 2002, 18, 82-9)がモルモットで光毒性ありと報告している。

Fenofibrate については In vivo での光毒性についての論文は見つからなかったが、Vargas et al (J Pharm Sci 1993, 82, 590-1)に光毒性物質と明確に記述されている。また、Diemer et al

(J Dermatol Sci 1996, 13,172-7)には in vitro で強い光毒性物質であることが示されている。

Furosemide については Selvaage & Thune (Photodermatol Photoimmunol Photomed 1997, 13:4-8)はヘアレスマウスで陽性であると報告している。また、Mauget-Faysse ら (Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001, 239:501-8)は Furosemide が強い光を浴びたヒトに起きた眼毒性の原因物質の可能性があると指摘している。一方、in vitro 実験で Vargas et al (1998)は Furosemide の光照射により一重項酸素を生ずること、また、溶血と脂質過酸化反応を起こすことを示しているが、末梢白血球細胞系では陰性であったと述べていることから、in vitro での作用には試験系により、また報告により相違があり、その理由については今後の検討課題である。

Ketoprofen については Sugiura et al (Photodermatol Photoimmunol Photomed 2002, 18:82-9)光アレルギーを9例経験したこと、また、モルモットでは光毒性を示さなかったが、強い光感作性を示すことを報告している。一方、Ljunggren および Lundberg (Photodermatol 1985, 2, 377-82)はマウスの尾を用いた試験で陰性と報告している。

6-Methylcoumarine については杉山ら(Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221)はモルモットの実験で陰性であったと報告しているが、宮内ら(Arch. Dermatol. 1983, 119, 736-739)はマウス試験で陽性であることを報告している。

Norfloxacin については Ferguson および Johnson (Br J Dermatol 1993, 128, 285-95)が正常人でUVAで弱い光毒性発現したと報告している。

Ofloxacin については、Jensen et al (J Antimicrob Chemother 1987, 20, 585-94)は患者に現れた副作用(23/26人)の多くが光感作性と dyspeptic reaction であったと示しているし、Scheife et al (Int J Dermatol 1993, 32, 413-6)もヒトで光毒性が発現したことを報告している。

Piroxicam は Mammen および Schmidt (Am Fam Physician 1995, 52, 575-9)は陽性例を1例報告している。一方、Ljunggren および Lundberg (Photodermatol 1985, 2, 377-82)はマウスの尾を用いた試験で陰性と報告している。

Protoporphyrine-F および Protoporphyrine-S の構造の確認はできていないが、Protoporphyrin は光毒性発現物質として良く知られており、Fort および Gold (Pediatrics 1989, 84, 1031-7)はヘアレスモルモットで、Ljunggren および Moller (Acta Derm Venereol 1978, 58, 125-30)はマウスで Protoporphyrin が光毒性示すことを報告している。

Tetracycline 類は光毒性物質として古くから良く知られているものであり、Demeclocycline については Lim et al (J Clin Invest 1983, 72, 1326-35)等で光毒性物質として引用している。また、Ljunggren (Moller H. Acta Derm Venereol 1978, 58, 125-30)はマウスで Tetracycline 類が光毒性試験で陽性であったと述べている。

3) 結論

今のところ、neutral red については in vivo 試験の情報で陽性であることが確認できていない。furosemide についてはドイツ、オーストリア、及びスイスのヒト光パッチテストグループが行った大規模なヒト光パッチテストで陰性であったことから、急性の光毒性については陰性と判断すべきであろう。他の薬物については、今回評価した3つの論文での記載には誤りは無いものと思われる。

以上

文責：大野泰雄

光毒性陽性物質とされた被験物質についての調査結果

公表データのまとめ (+ :in vivo陽性、- :in vivo陰性、+/-:判定保留、PI: photoirritant、PA: photoallergic agent、NP: non-photoirritant、NA: not available)

化合物名 (Fitzpatrickの総説および他のin vivo試験で陽性が確認されたものは背景を茶色にした。)	EU/COLI PAのvivoデータ(動物)	EU/COLI PAのvivoデータ(ヒト)	Fitzpatrick et al. (1974) In Sunlight and Man, Ed. by Thomas B. Fitzpatrick, University of Tokyo Press, p3-14.	宮地ら Arch. Dermatol. 119, 736-739 (1983) マウス試験	戸倉 J. Dermatol. Sci. 18, 1-10 (2001) ヒト光感作性総説	ECVAM workshop報告 ヒトパッチ試験結果 Spielmannら (2000)	小林ら、皮膚毒性、毒性試験法講座7機能毒性学、福原、小野編集、地人書館1989、	その他の文献調査結果
3-Benzilidene camphor	-	-						
4-Methyl benzilidene camphor	-	-						
5-MOP	+	+	PI				PI	Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陽性
6-Methylcoumarin	+	+		PA	PI			Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陰性
8-MOP	+	+	PI		PI		PI, p288各種の動物で光毒性有り。	
Acridine -free base	+	+	PI					Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陽性
Acridine hydrochloride	+	+	PI				PI	
Amiodarone	+	+						Ljunggren B, Moller H. Acta Derm Venereol 1978;58(2):125-30 マウスin vivo試験で陽性。Weber H, Weissel M, Haddad R, Scheibelhofer W, Konrad K, Mlczoch J, Probst P, Mainitz M. Wien Klin Wochenschr 1984 Sep28; 96(18):685-96 光毒性が59人の患者の内31%に現れた。
Anthracene	+	+	PI				PI	Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陽性
Benzilidene Camphor sulphonic acid	-	-						
Benzophenon-4 (2)	NA	+/-						Sugiura et al, Photodermatol Photoimmunol Photomed 2002 Apr;18(2):82-9がモルモットで光毒性ありと報告している。
Bergamot oil	+	+	PI					Girard J, Unkovic J, Delahayes J, Lafille C., Dermatologica 1979;158(4):229-43 モルモットとヒトで陽性。

Bithionol	+	+	PI	PA	PI	PI (0.95%)		
Cinnamic aldehyde	-	-						
Chlorhexidine (2)	NA	-	PI					
Chlorpromazine	+	+	PI	PA	PI	PI (5.63%)	Epstein, J.H., Brunsting, L.A., Petersen, M.C. (1957) J. Invest. Dermatol. 28, 329. 光毒性物質。 Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陽性	
Demeclocycline	+	+	PA				Lim HW, Novotny H, Gigli I. J Clin Invest 1983, 72:1326-35 等で光毒性物質として引用。 Ison A, Blank H., J Invest Dermatol 1967, 49, 508-11 ではマウスで、 Sams WM Jr, Epstein JH. J Invest Dermatol 1967, 48, 89-94 はモルモットで光毒性を調べている。 abstractが無く、 陽性か否か不明。	
Doxycycline	+	+	PI		PA		Bjellerup M, Ljunggren B: Photodermatol 1987 Dec;4(6):281-7 ヒトで光毒性発現。 PI (Harber, L.C., tromovich, T.A. Baer, R.L. (1961) J. Invest. Dermatol., 15, 317.)	
Fenofibrate	NA	+					In vivoでの光毒性についての論文は見つからなかったが、 Vargas F, Rivas C, Canudas N. J Pharm Sci 1993 Jun;82(6):590-1 に phototoxic antihyperlipoproteinemic drug fenofibrate と明確に記載されている。 Diemer et al, J Dermatol Sci 1996, 13,172-7で in vitro で強い光毒性物質。	
Furosemide	NA	+				NP (予備試験結果で陰性であったため本試験は行わず)	Selvaage & Thune. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1997, 13:4-8 マウスで陽性。 Mauget-Faysseら Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001, 239, 501-8 強い光を浴びたヒトに起きた眼毒性の原因物質の可能性あり。 Vargas et al, J Photochem Photobiol B 1998, 42, 219-25 で光による溶血と脂質過酸化反応がでた。 しかし末梢白血球細胞系では陰性。 Selvaag Arzneimittelforschung 1997 Jan;47(1):97-100 では in vitro 試験で陰性。 同著者による1997の論文では in vitro/vivo では陽性(Selvaagら, In Vivo 11(1):103-7 1997)。	
Hexachlorophene	-	+/-	PI		PI	PI (2.54%)		

Ketoprophen	-	+/-		陰性 (cyclophosp amide処置で 陽性)	PI			Sugiura et al, Photodermatol Photoimmunol Photomed 2002 Apr;18(2):82-9 光アレルギーを9例経験。モルモットでは光毒性を示さなかったが、強い光感作性を示した。Bagheri et al, 疫学的検討でNSAIDによる光アレルギーの主な原因であると報告。Drug Saf 2000 May;22(5):339-49 一方、Ljunggren B, Lundberg K. Photodermatol 1985 Dec;2(6):377-82 はマウスの尾を用いた試験で陰性。Becker L, Eberlein-Konig B, Przybilla B, Acta Derm Venereol 1996 Sep;76(5):337-40 in vitro試験において可視光で陽性、UVAで弱い陽性。
L-histidine	NA	NA						
Lauryl sulfate	NA	NA						
Musk ambrette	-	+/-		PA	PI	PI (1.11%)		
Nalidixic acid	+	+	PI					Ljunggren B, Moller H. Acta Derm Venereol 1978;58(2):125-30 マウスin vivo試験で陽性。Birkett et al, Brit. J. Dermatol., 1969, 81, 342. 全身性光毒性物質である。
Nalidixic acid Na	+	+	PI				PI	
Neutral red	+	+						直接の文献無し
Norfloracin	+	+			PI			Ferguson J, Johnson BE, Br J Dermatol 1993, 128, 285-95 正常人でUVAで弱い光毒性発現。cyprofloxacinも
Octyl methoxycinnamate	-	-						
Octyl salicylate	-	-						
Ofloxacin	+	+			PI			Jensen et al, J Antimicrob Chemother 1987 Oct;20(4):585-94 患者に現れた副作用(23/26人)の多くが光感作性と dyspeptic reactionであった。Scheife RT, Cramer WR, Decker EL Int J Dermatol 1993 Jun;32(6):413-6 ヒトで光毒性発現。
PABA	-	+/-	PA		PI	PI (0.71%)		
Penicilin G	NA	NA						
Piroxicam	-	+			PI			Mammen L, Schmidt CP, Am Fam Physician 1995 Aug;52(2):575-9 で一例陽性と報告。一方、Ljunggren B, Lundberg K. Photodermatol 1985 Dec;2(6):377-82 はマウスの尾を用いた試験で陰性。Becker L, Eberlein-Konig B, Przybilla B, Acta Derm Venereol 1996 Sep;76(5):337-40 in vitro試験において可視光で陽性、UVAで陰性。
Polyacrylamido methy benzylidene-camphor	-	-						
Promethazine	+/-	+				PI (5.15%)		Ljunggren, J. Inves. Dermatol., 1977, 69, 383, Sidi et al. J. Invest. Dermatol. 1955, 24, 345. 全身性光毒性物質である。

Protoporphyrin F	+	NA							Maier et al, Ann Thorac Surg. 2001, 72, 1136-40. hematoporphyrin誘導体は光毒性を示す。 Fort FL, Gold J. Pediatrics 1989 Dec; 84(6):1031-7 ヘアレスモルモットで protoporphyrinが光毒性示す。 Ljunggren B, Moller H. Acta Derm Venereol 1978; 58(2):125-30 マウスで protoporphyrinが光毒性示す。
Protoporphyrin S	+	NA							Maier et al, Ann Thorac Surg. 2001, 72, 1136-40. hematoporphyrin誘導体は光毒性を示す。 Fort FL, Gold J. Pediatrics 1989 Dec; 84(6):1031-7 ヘアレスモルモットで protoporphyrinが光毒性示す。 Ljunggren B, Moller H. Acta Derm Venereol 1978; 58(2):125-30 マウスで protoporphyrinが光毒性示す。
Rose Bengal (2)	-	+	PI						Kumar JR, Haberman HF, Ranadive NS., J Photochem Photobiol B 1997 Feb; 37(3):245-53 ウサギで急性の光毒性を示した。 Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陰性。
SLS	NA	NA							
TCSA	+	+	PA	PI	PI (0.63%)				Sugiyama et al, Alternative Methods in toxicol. Vol 10, 213-221. モルモットで陽性。
Terephthalidine dicamphor sulphonic acid	-	-							
Tetracycline	+	+		PI				PI	Ljunggren B, Moller H. Acta Derm Venereol 1978; 58(2):125-30 マウスで tetracycline 類が陽性
Thiourea	NA	-							
Tiaprofenic acid	+	+						PI (被験物質の中で最も強かった)	
Uvinul MS40	NA	+/-							